

Outils d'étude pour caractériser l'impact de l'hydrodynamique sur la culture de cellules animales adhérentes cultivées sur microporteurs en bioréacteurs à cuve agitée..

Colloque « Bioprocédés-Bioproduction », Paris, Juillet 2014

Marie-Laure Collignon et Eric Olmos



Message principal de mon exposé

**L'importance de l'hydrodynamique et du mélange
sur le résultat de culture**

**Aussi essentiel que la composition du milieu de culture, la
température de culture ect...**

Choix rationnel :

- Du type d'un design bioréacteur**
- De ses conditions de fonctionnement**

→ Besoin d'OUTILS pour étudier cet impact

Illustré dans le cadre de culture de cellules animales

Spécificités de la culture de cellules animales

Production de vaccins, de glycoprotéines, anticorps monoclonaux

Chiffre d'affaire en 2010 de 100 milliards de dollars (Walsh, 2010)

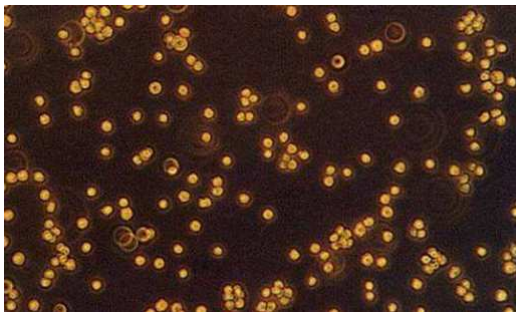
Caractéristiques spécifiques:

Temps de doublement long : 20 h (50 fois +)

Respiration faible: $0,4 \mu\text{mole d'O}_2 \cdot 10^6 \text{ cellules.h}^{-1}$ (10 fois -)

Cellules en suspension

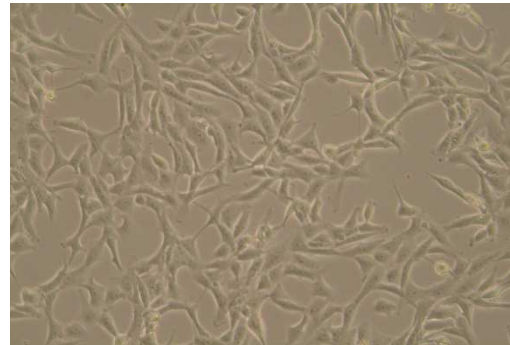
(CHO, BHK, hybridomes,...)



(Barbouche, 2008)

Cellules adhérentes

(Vero, CShM, ...)



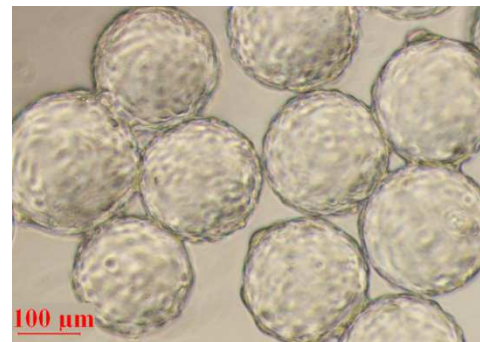
Procédé d'expansion de cellules adhérentes

1) En T-flask



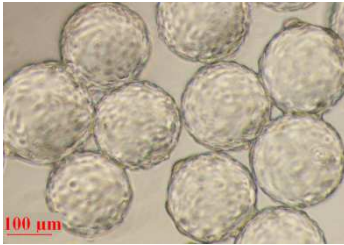
Surface limitée (25-75-175 cm²)
Manutention importante
➔ Risque de contamination

2) En mode agité



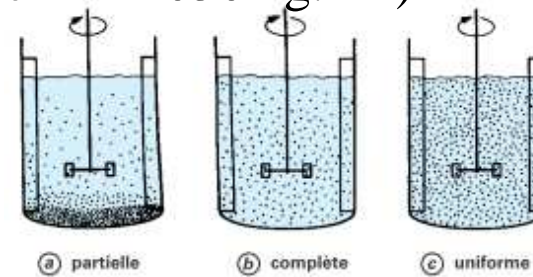
Mise en suspension des microporteurs

Différents billes en polymère: Cytodex 1, Cytodex 3, Hillex II, Cultispher, ...



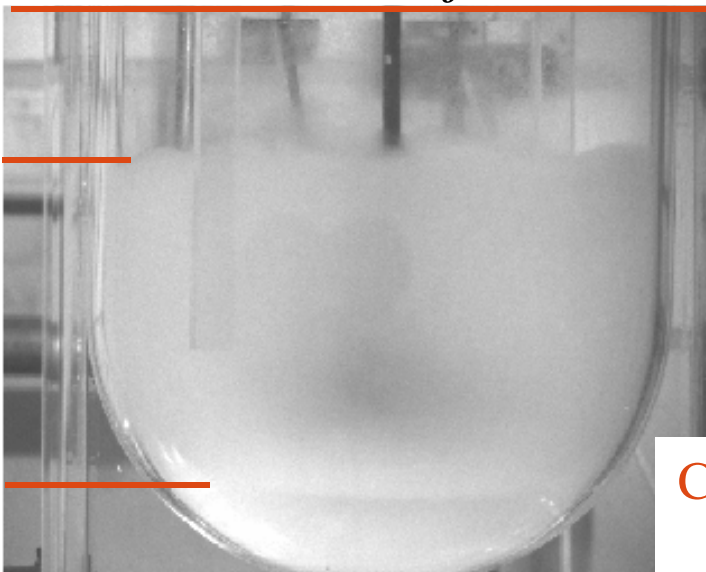
- $d_p \sim 200\text{-}300\ \mu\text{m}$
- ρ légèrement $>$ au milieu de culture
(par ex: Cytodex 1 = $1030\ \text{kg.m}^{-3}$)

3 régimes de mise en suspension:

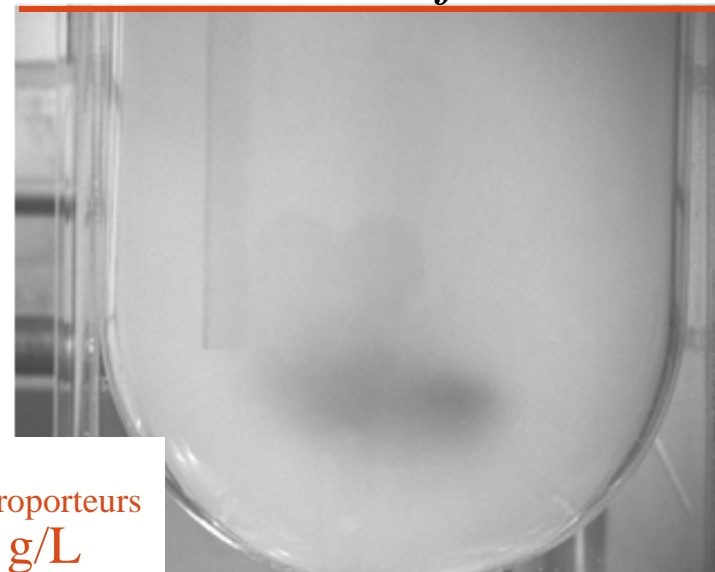


(Roustan et al, 1999)

$$N < N_{js}$$



$$N > N_{js}$$

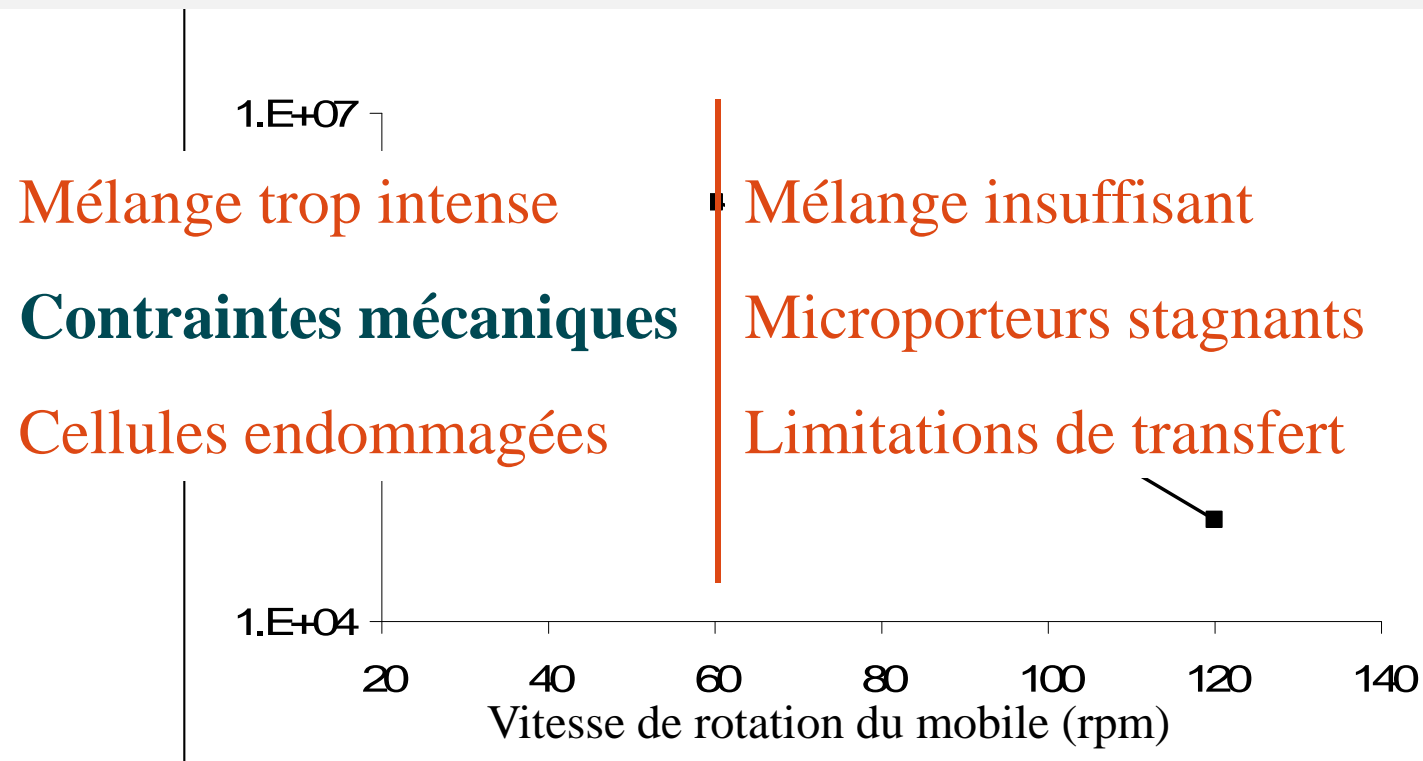


$C_{\text{microporteurs}}$
9 g/L

Impact de l'hydrodynamique mise en évidence dans les années 80-90: deux limitations

Travaux de Papoutsakis et al. (1986-1991), Croughan et al. (1986-1988)

Concentration cellulaire (cellules.mL⁻¹) après 5 jours de culture en spinner de 250 mL.
Concentration initiale = $8 \cdot 10^4$ cellules.mL⁻¹ (issus de Hirtenstein et Clark, 1981)

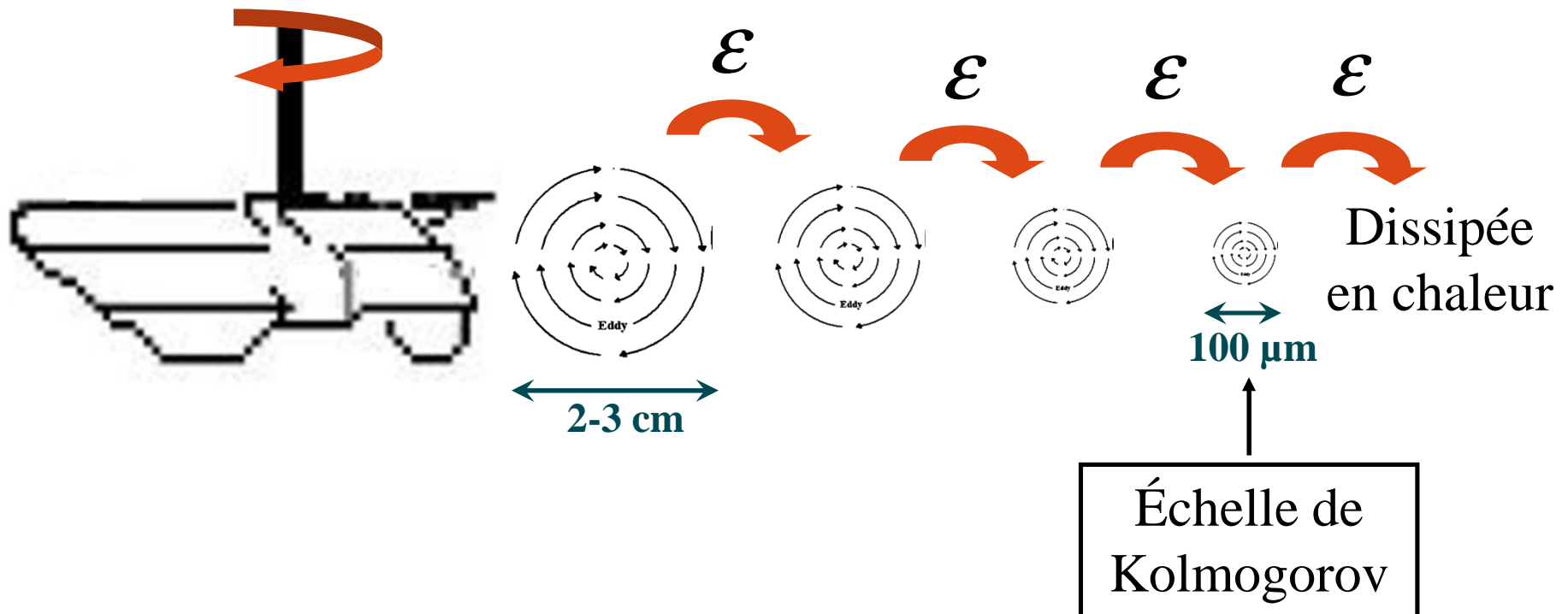


Cascade d'énergie de Richardson et Kolmogorov

Écoulement turbulent → tourbillons

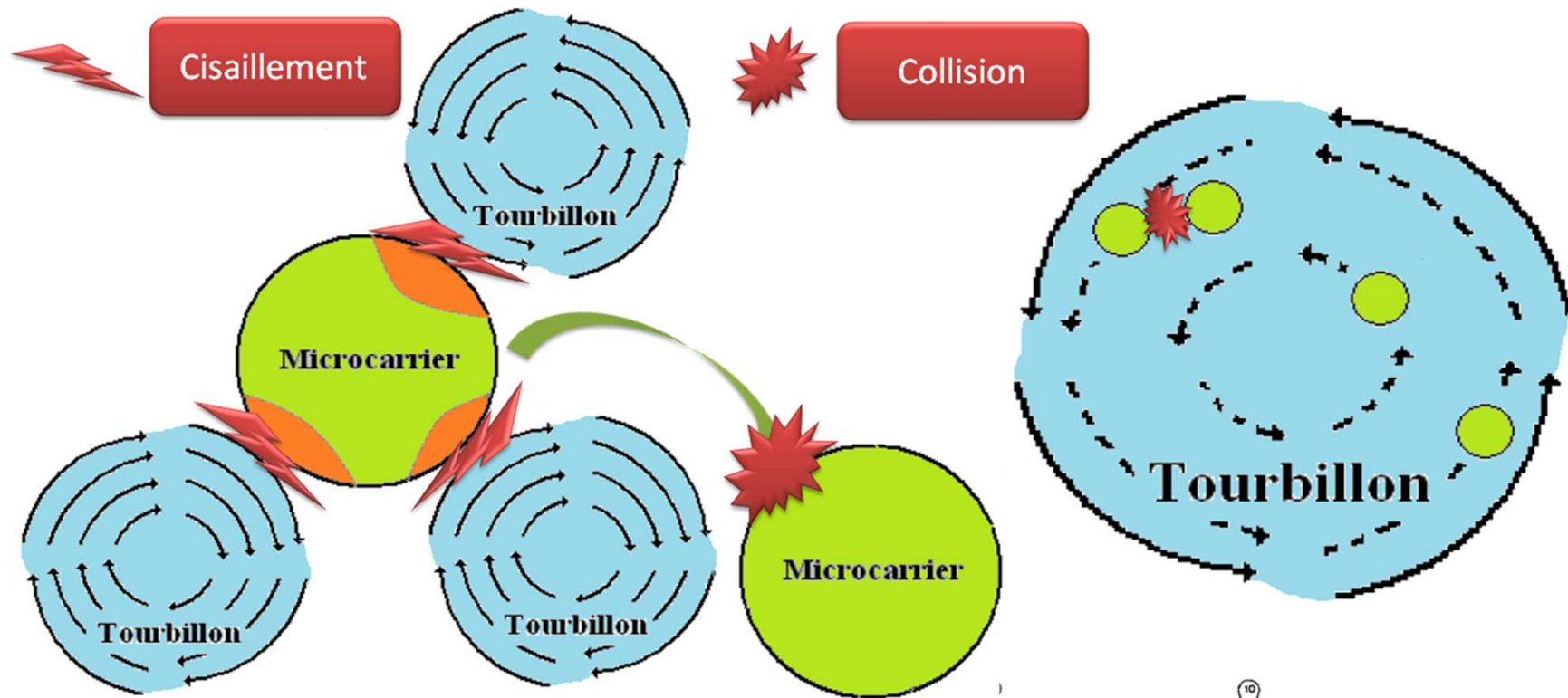
Apport d'énergie
mécanique par le
moteur

Transfert d'énergie à taux constant ε

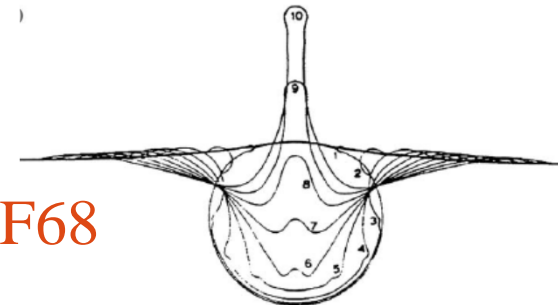


Evènements générateurs de contraintes mécaniques d'après Papoutsakis et al. , Croughan et al.

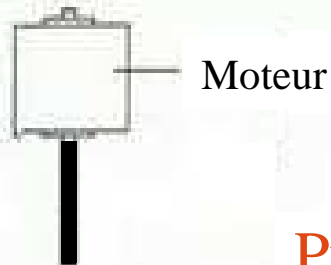
Au sein de l'écoulement liquide-solide



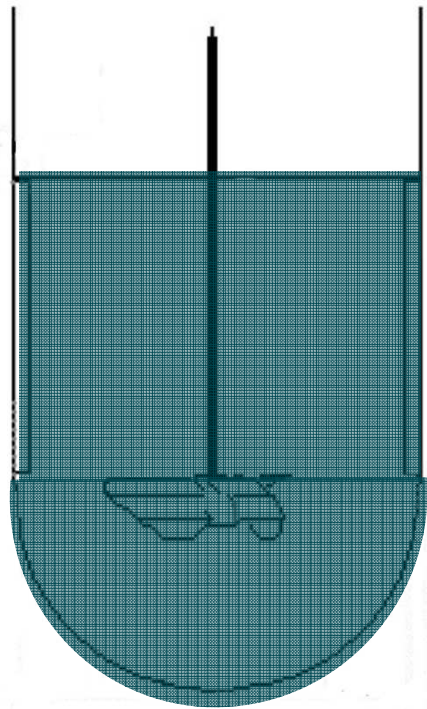
Aération, limitée par l'ajout de Pluronic F68



Quantification via une mesure moyenne pour l'ensemble du bioréacteur à cuve agitée



Puissance $P = f$ (type de mobile, N)



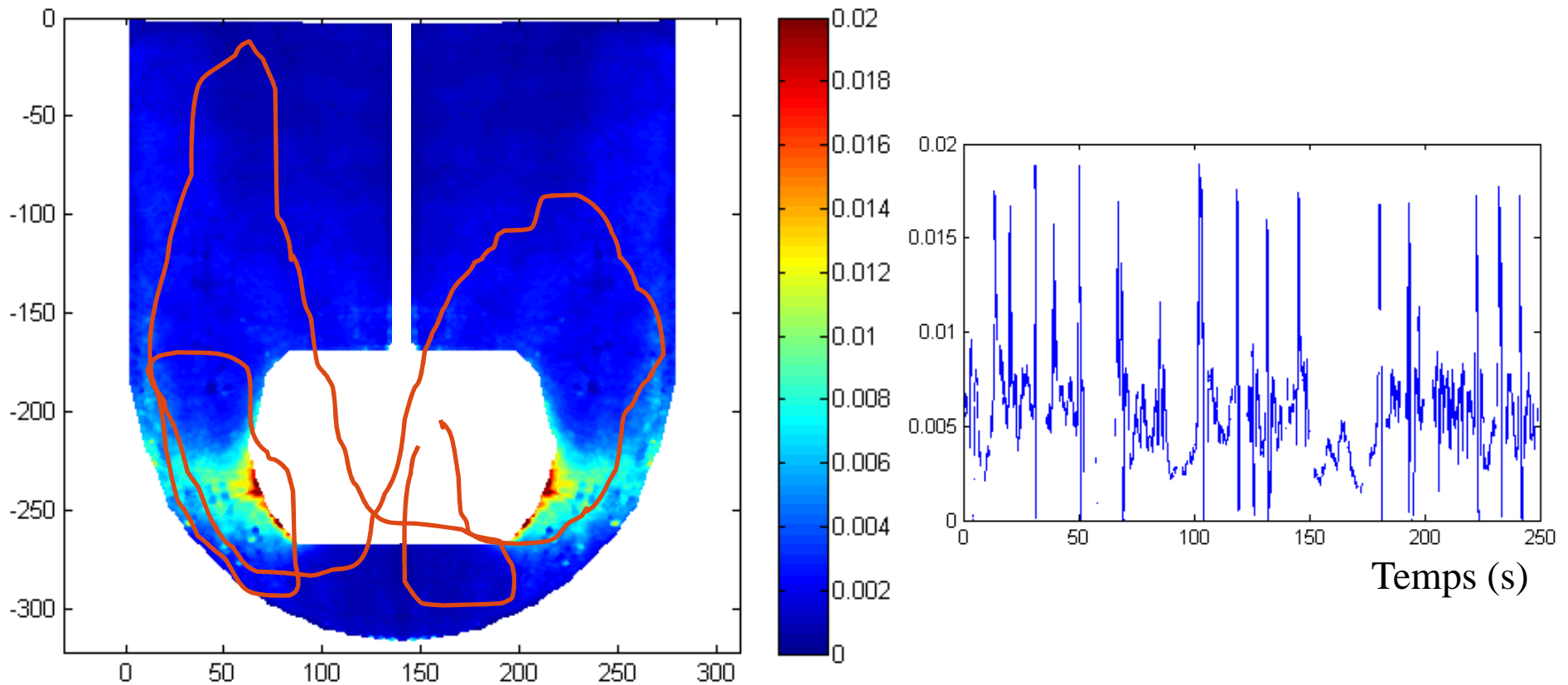
$$\varepsilon_{moyen} = \frac{P}{\rho_l V}$$

Si $\varepsilon_{moyen} \nearrow$

Contraintes mécaniques \nearrow

$$\lambda_{K,moyen} = \left(\frac{v^3}{\varepsilon_{moyen}} \right)^{1/4}$$

Distribution spatiale extrêmement hétérogène



L'environnement hydrodynamique local évolue au cours du temps

Nécessité de revisiter le sujet de recherche

Questions scientifiques:

- Représentativité des valeurs moyennes vis-à-vis du « comportement » des cellules animales?
- Validités des préceptes établis pendant 30 ans?

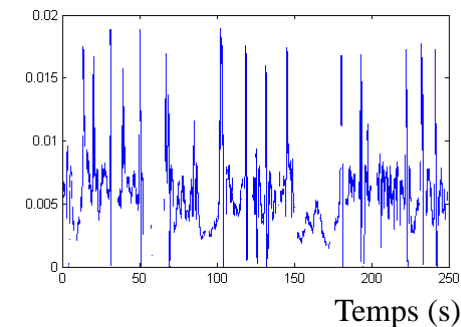
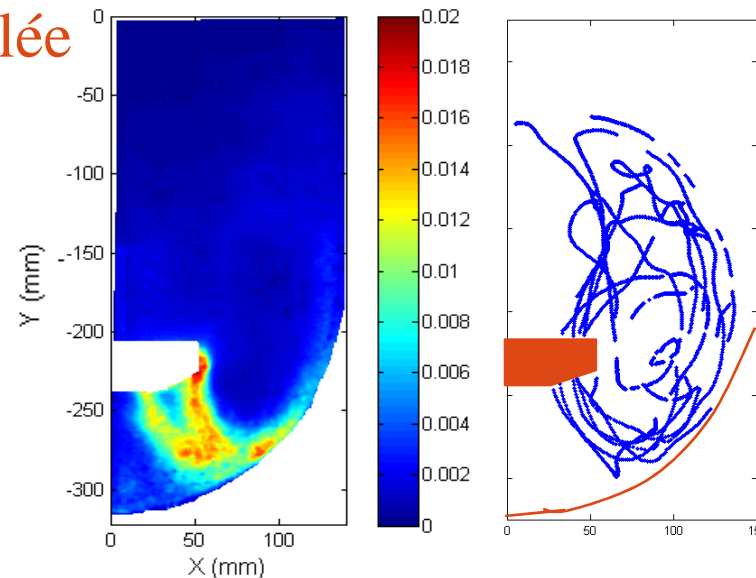
Catalyseurs du regain d'intérêts

- Approche scientifique Quality by design (vs ~~approche empirique~~) imposée par les autorités régulatrices
- Mise au point des procédés d'expansion de culture de cellules souches sur microporteurs.

Revisite de la question: Approche Euler-Lagrange

Décrire la succession temporelle d'environnements hydrodynamiques rencontrés par une cellule fixée sur un microporteur

- 1) **Sélection** de géométries de référence
- 2) **Étude eulérienne**: 3D-P.I.V. et modèle CFD RANS ou LES
- 3) **Étude lagrangienne**: trajectographie optique et tracking numérique
- 4) **Étude couplée**

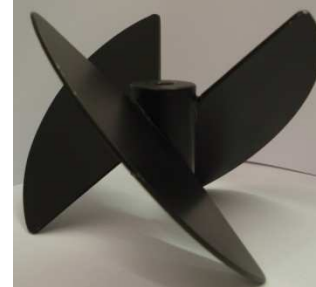
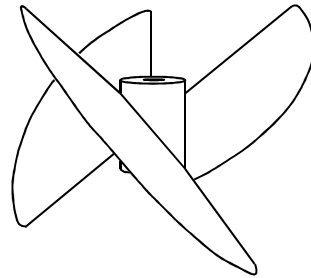


Évolution temporelle
des conditions
rencontrées

Sélection de géométries

Mobiles

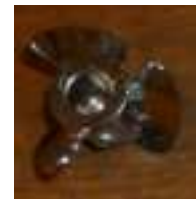
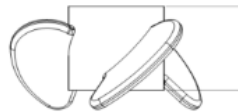
Mobiles axiaux pour minimiser Njs



Oreille d'éléphant (EE)



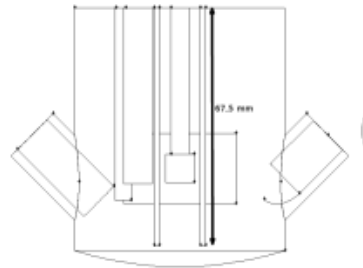
Hélice TTP ou HTPG



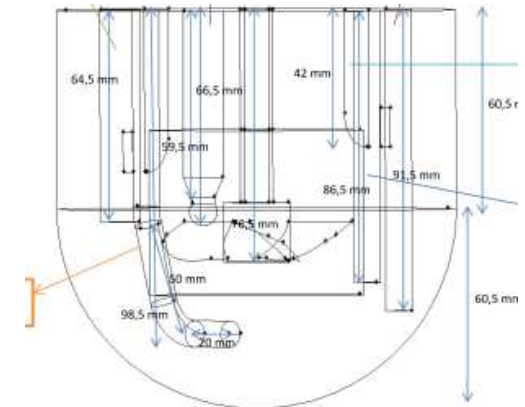
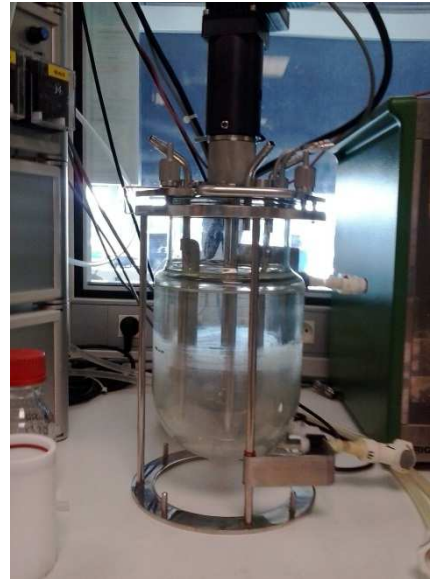
Hélice marine

Cuves

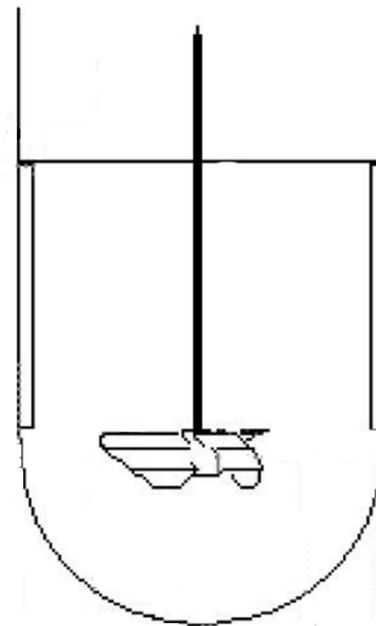
Cuves à fond bombé avec contre-pales et/ou sondes



Minibio de 0,2 L



Trython de 1,2 L

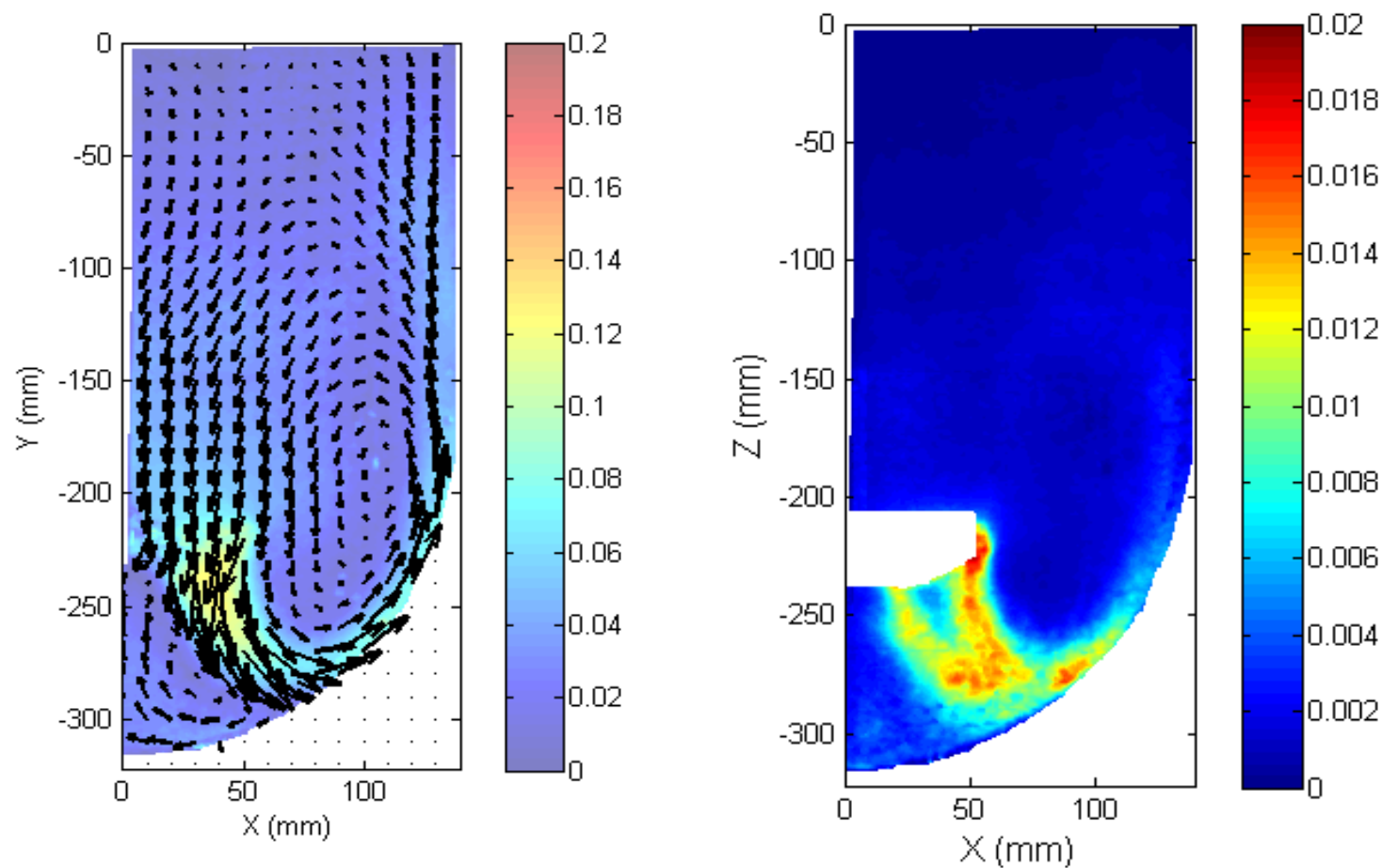


Cuve modèle de 20 L

Caractérisation eulérienne

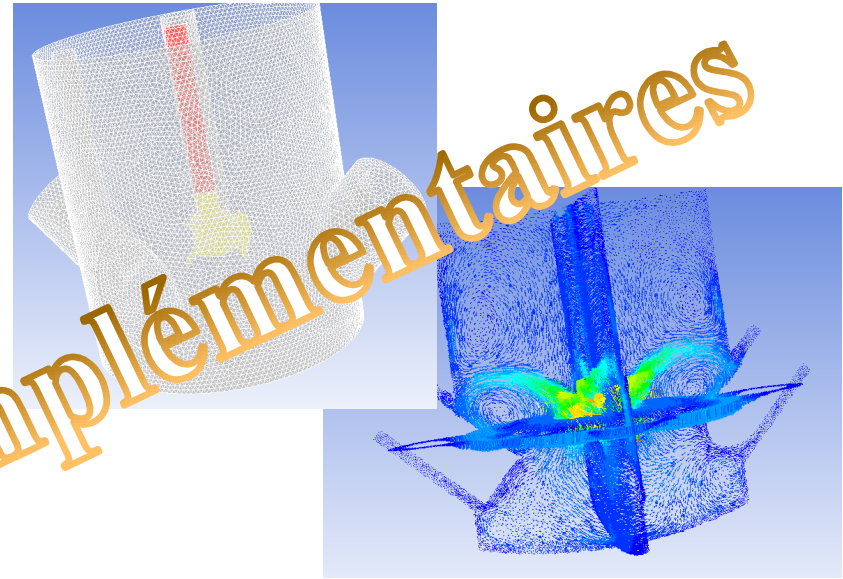
Pourquoi?

Etablir des **cartes quantifiant la répartition spatiale** de grandeurs clés de l'écoulement



Comment?

Expérimentalement (PIV) et/ou par simulation numérique (CFD)



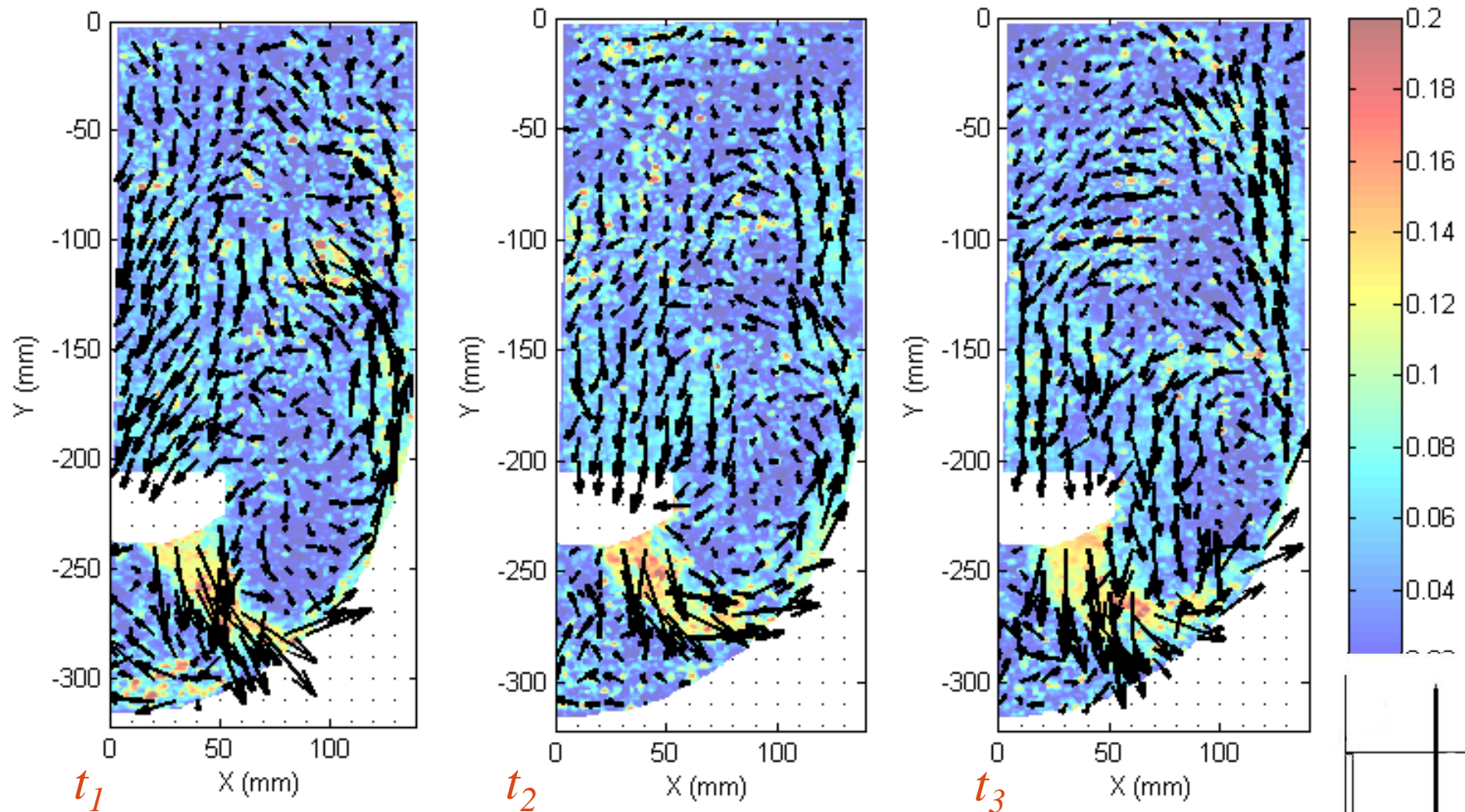
Données limitées à un **plan de mesure**
Info 3D si symétrie de révolution
mais contres-pales et plongeurs

Informations 3D

Mesures brutes

Résultats dépendant du modèle

Traitement: Champs instantanés

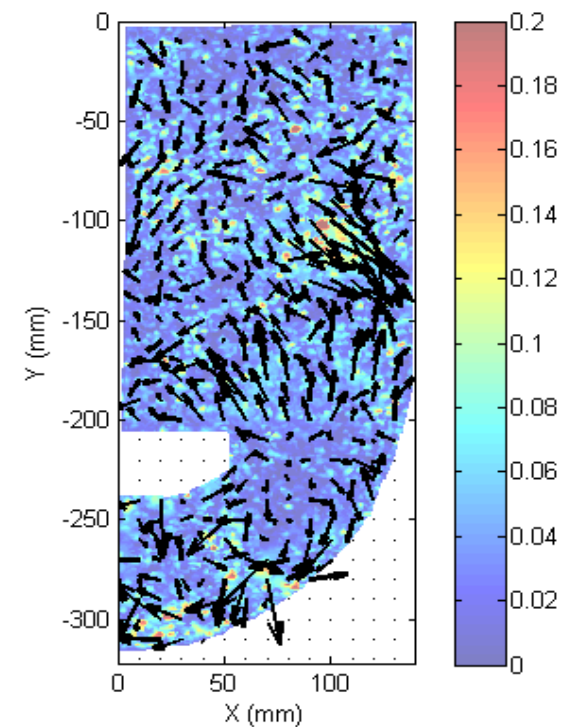
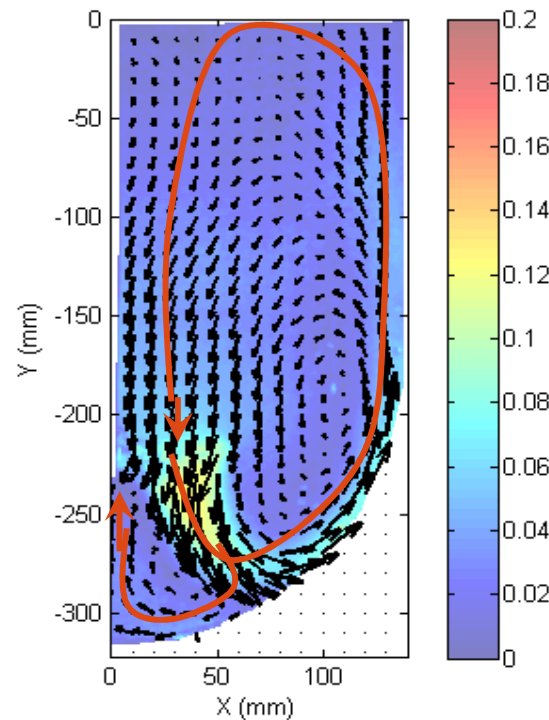
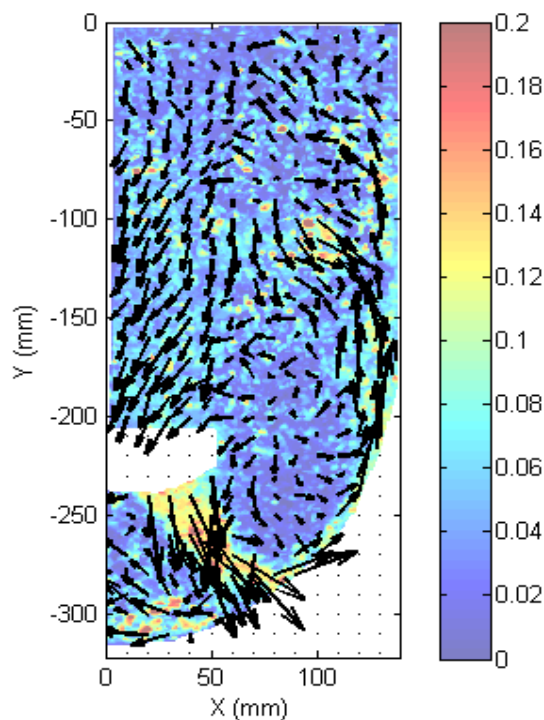
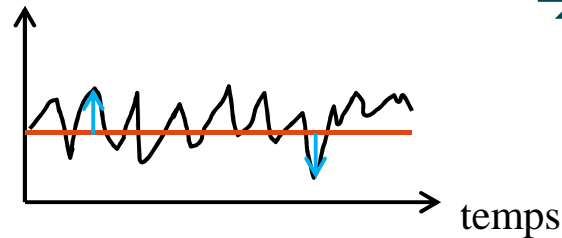


Très variables => difficulté à décrire

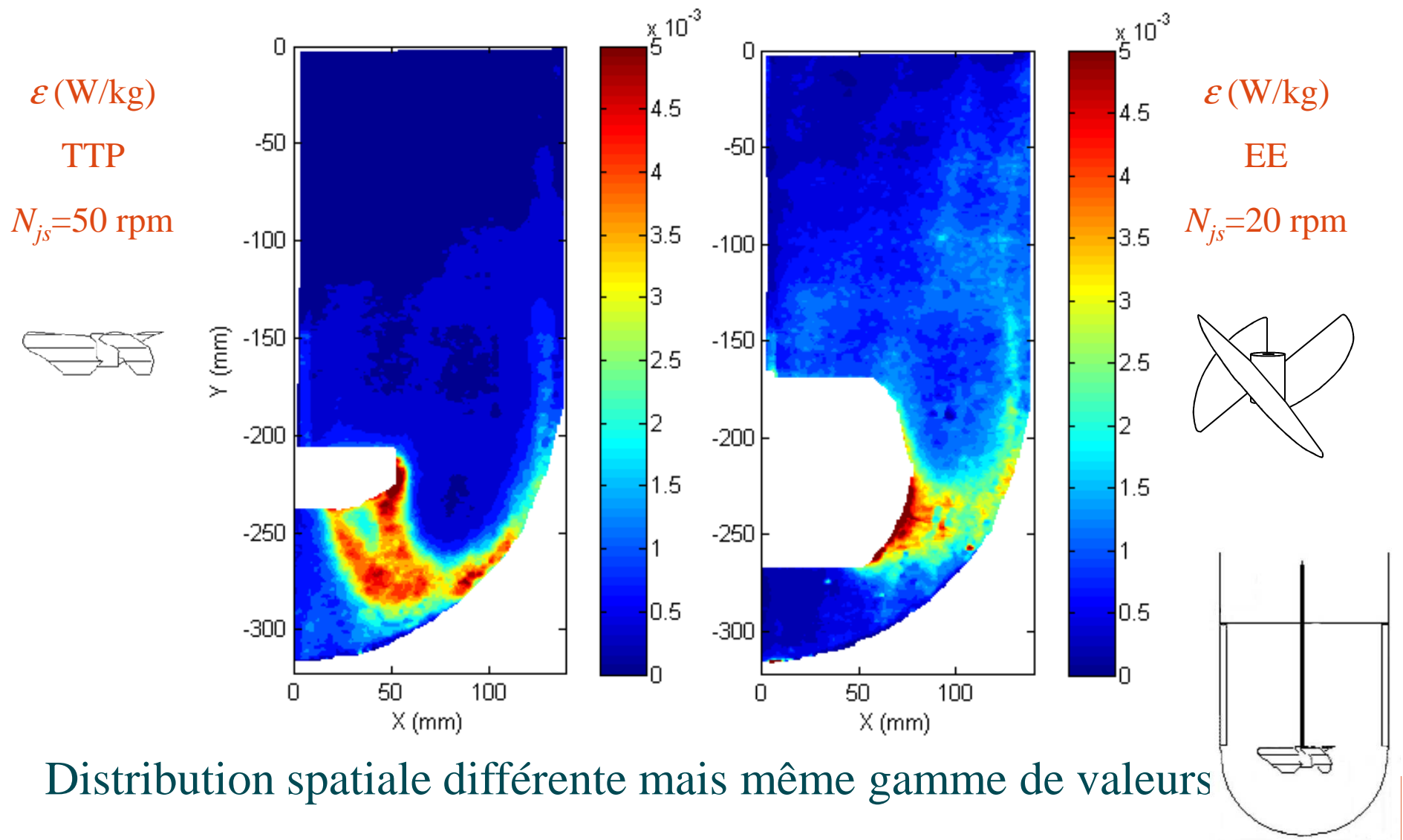
Décomposition de Reynolds : écoulement turbulent

$$u(x, y, z, t) = \overline{u}(x, y, z) + u'(x, y, z, t)$$

→ énergie, ε , λ_k , contraintes



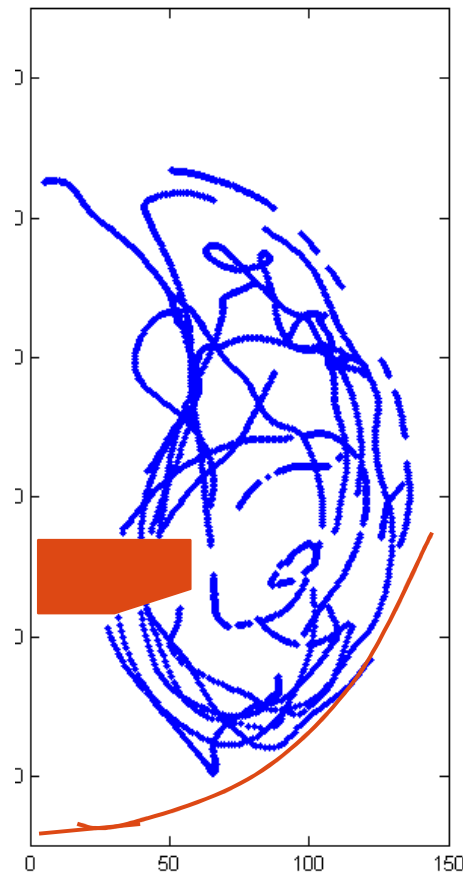
Exploitation de résultats: Taux de dissipation de l'énergie cinétique turbulente ε



Caractérisation lagrangienne

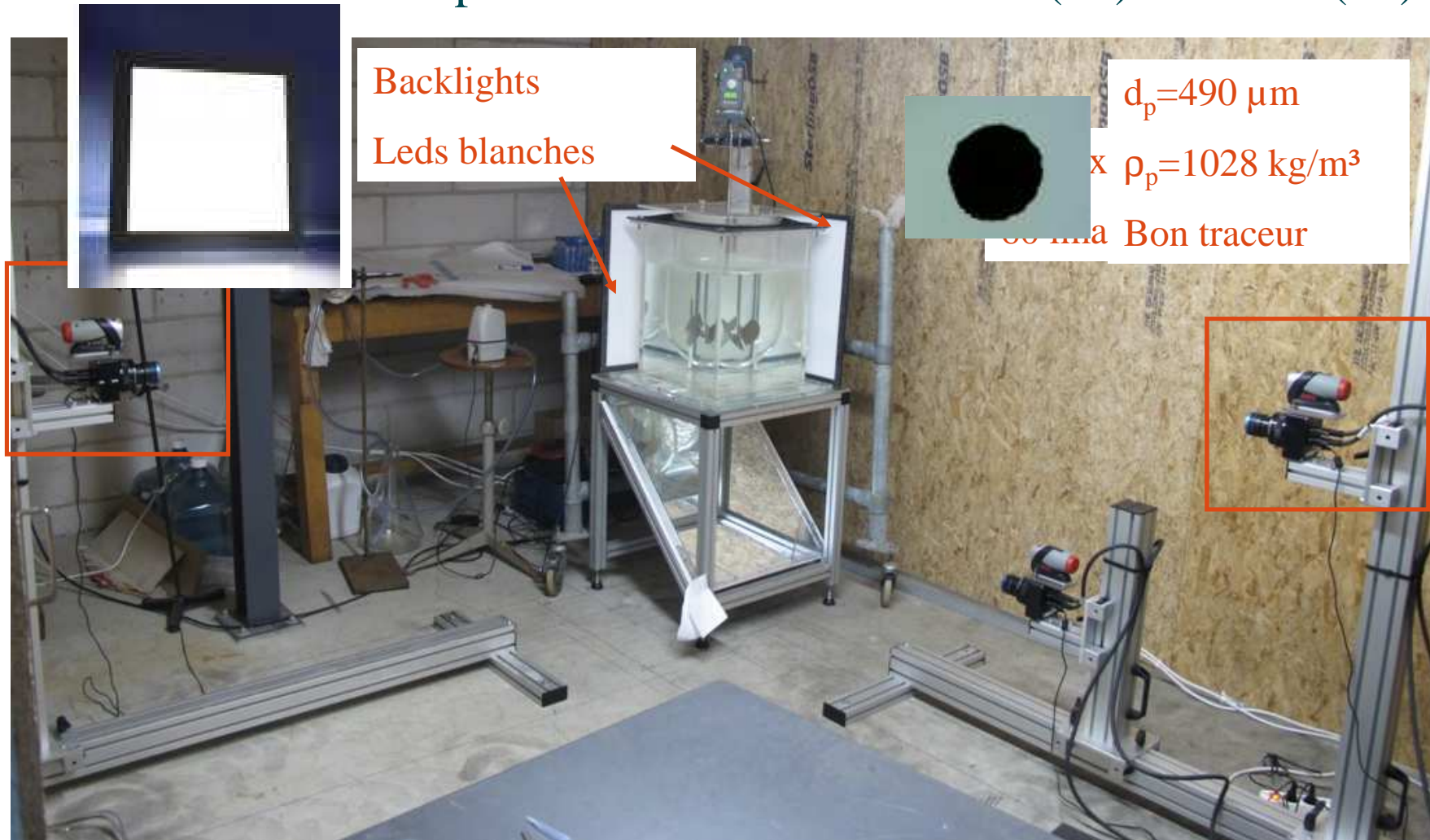
Pourquoi?

Déterminer **la trajectoire** suivi par une particule au cours du temps dans le bioréacteur



Comment: Dispositif de trajectographie optique

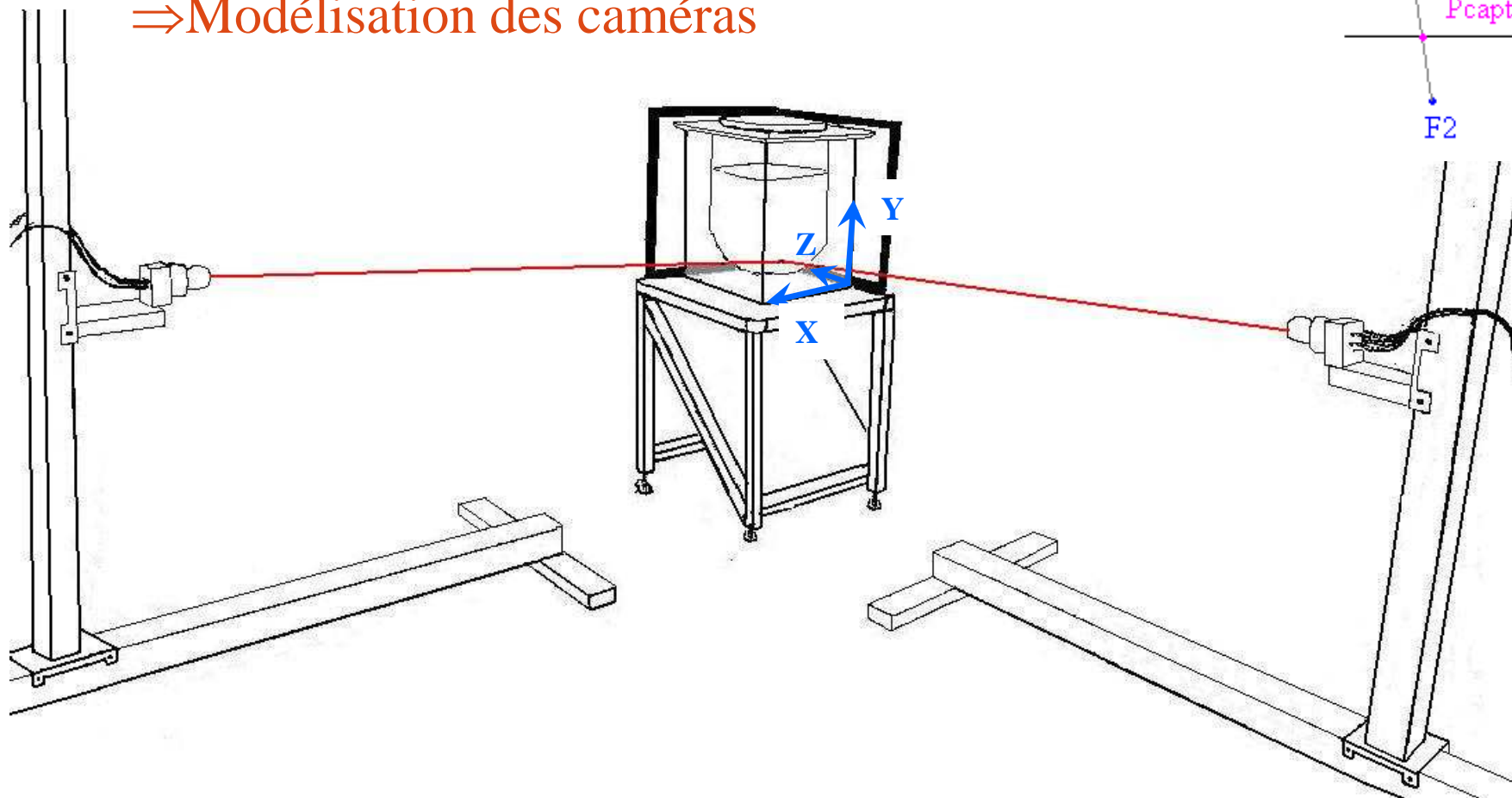
Inspiré des travaux de Wittmer (97) et Petiot (99)



Modélisation

Position (X, Y, Z) de la particule =
Intersection des deux faisceaux

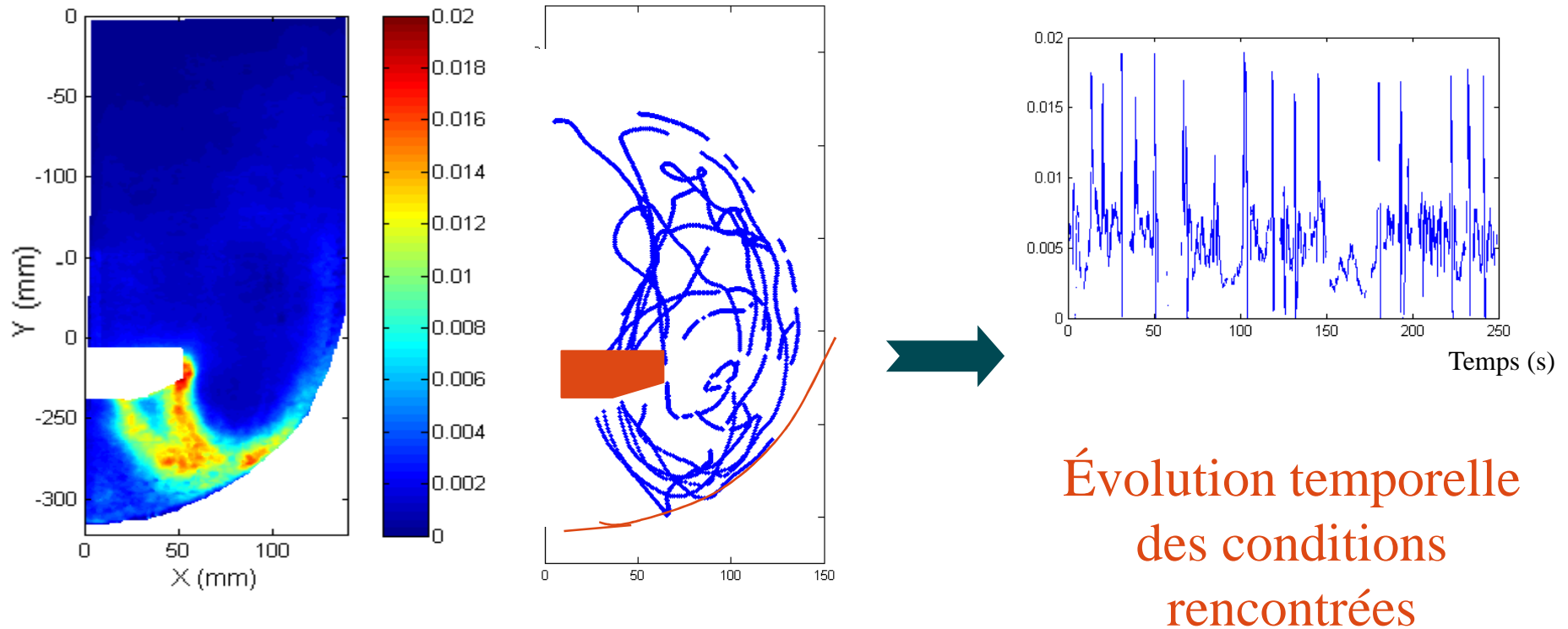
⇒ Modélisation des caméras



Etude couplée

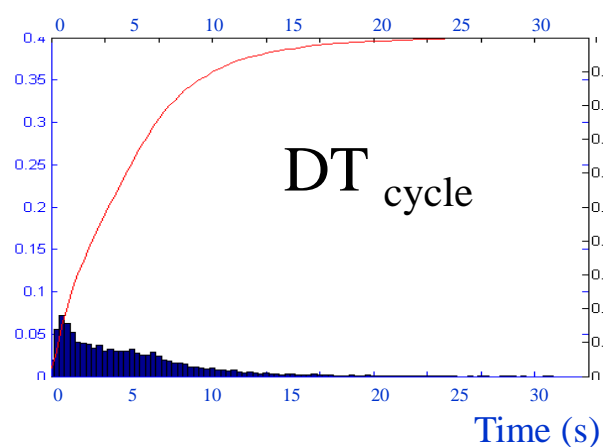
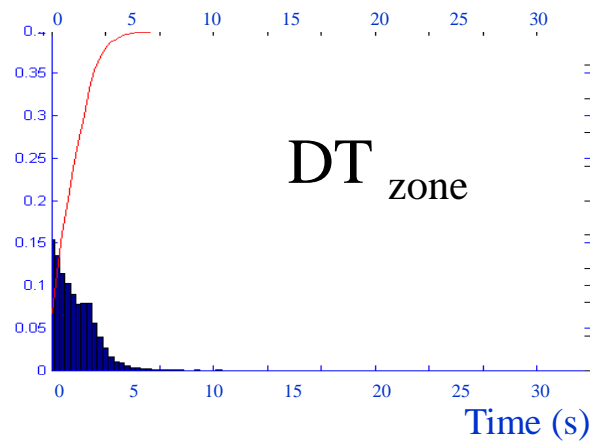
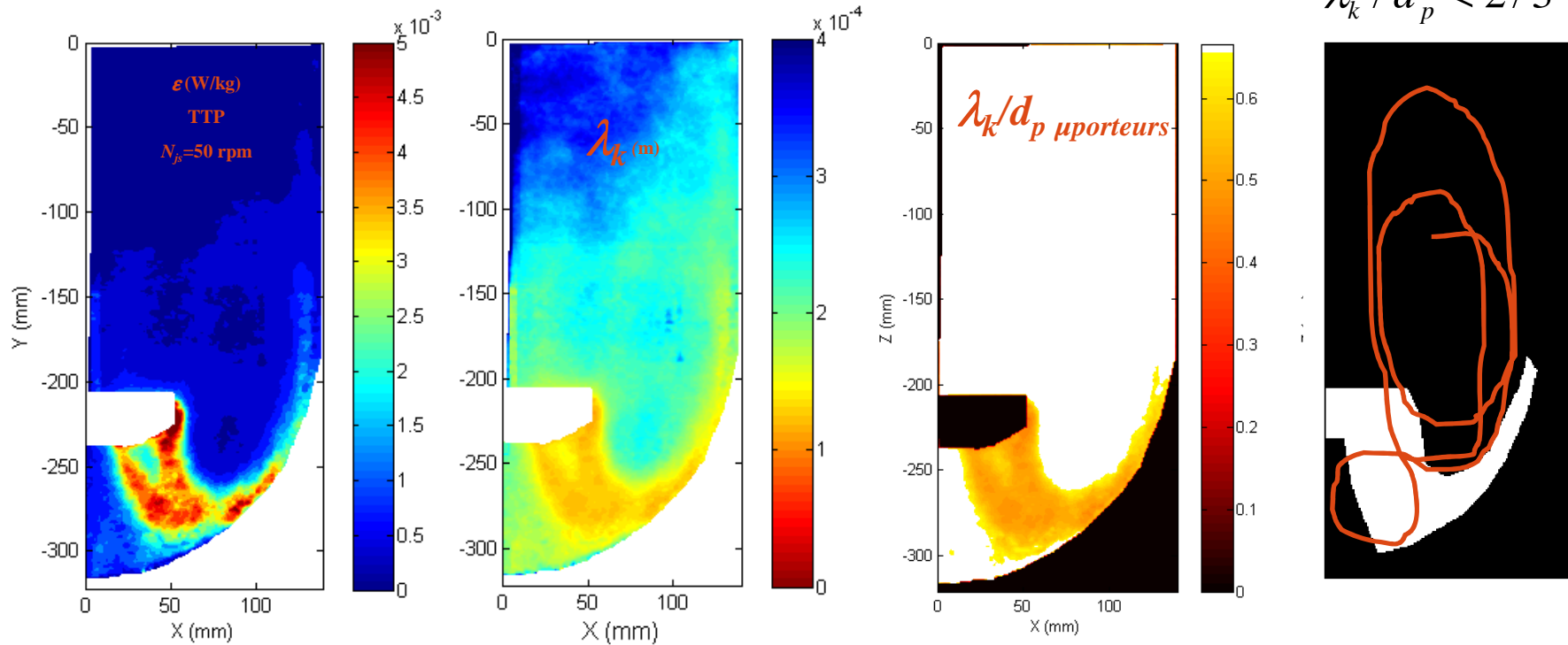
Pourquoi?

Superposer les trajectoires sur les cartes eulériennes



Exemple de résultats

$$\lambda_k / d_p < 2/3$$



Discussions:

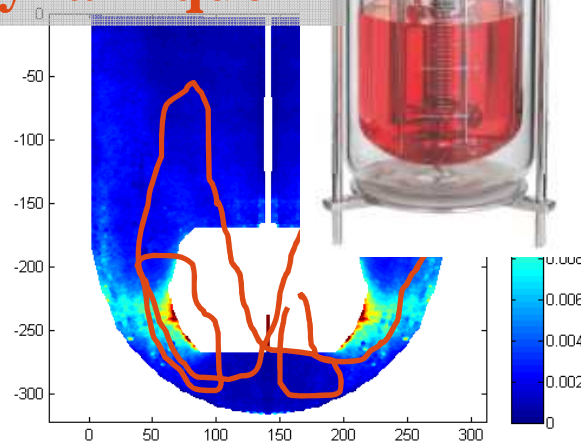
- Type de mobile
 - N
- Critère λ_k/d_p

Couplage hydro-biologique

Objectifs

Design et conditions
opératoires (N, ...)

L'hydrodynamique



La réponse de cellules
adhérentes cultivées sur
microporteurs

Modèle intégré prédictif (bilan de population)

→ Règles de montée en échelle basé sur une description à
l'échelle locale

Message principal de mon exposé

**L'importance de l'hydrodynamique et du mélange
sur le résultat de culture**

Choix rationnel :

→ **Du type d'un design bioréacteur (cuve, type de mobile)**

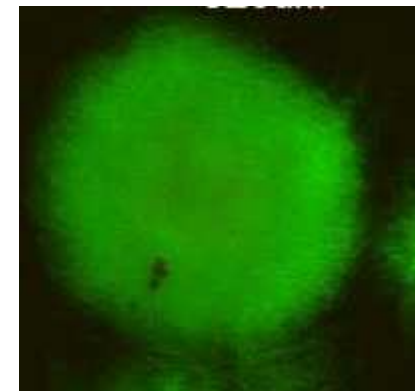
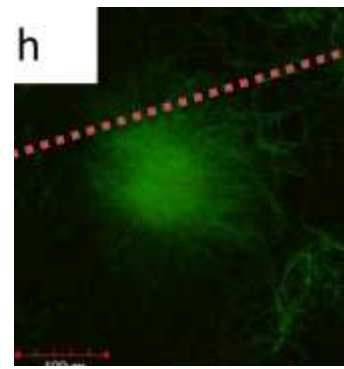
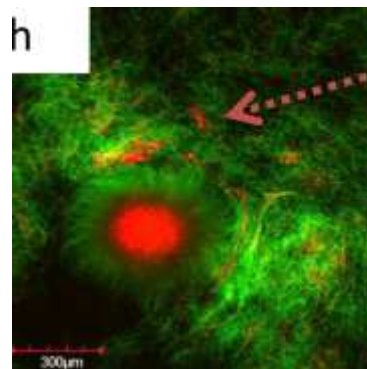
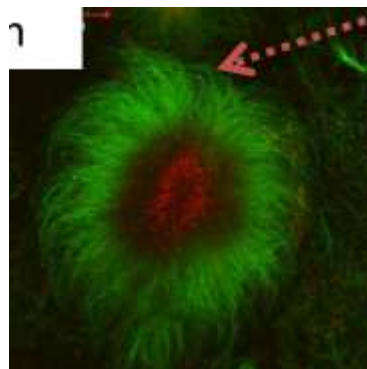
→ **De ses conditions de fonctionnement (N)**

→ **Basé sur des OUTILS pour étudier cet impact**

Généralisable à de nombreux procédés biotechnologiques

Structure des pelotes formées par *Streptomyces pristinaespiralis* après 40h de culture

(E.Olmos et S. Delaunay)



Culture en fioles à faible, modéré et forte agitation

Culture en réacteur à lit fluidisé

Merci pour votre attention

Questions?

